



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> <b>C07K 15/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 92/07000</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 30 avril 1992 (30.04.92)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR91/00835 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 octobre 1991 (23.10.91) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 90/13101 23 octobre 1990 (23.10.90) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67082 Strasbourg Cédex (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> CHAMBON, Pierre [FR/FR]; 4, rue du Dr.-Albert-Schweitzer, F-67113 Blaesheim (FR). KIENY, Marie-Paule [FR/FR]; 7, rue Aloïse-Quintenz, F-67000 Strasbourg (FR). LATHE, Richard [GB/GB]; 1A The Avenue, Leeds LS8 (GB). HAREUVENI, Mara [IL/IL]; 2/30 Haneviim Str., 47 279 Ramat-Ha-Sharon (IL).		<b>(74) Mandataire:</b> WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OR PREVENTION OF A MALIGNANT TUMOR <b>(54) Titre:</b> COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION D'UNE TUMEUR MALIGNE  <b>(57) Abstract</b> <p>Pharmaceutical composition for the treatment or prevention of a malignant tumour comprising, as therapeutic agent, a polypeptide recognized by the hybridoma-produced antibody (ATCC n° HB 8630), or alternatively a virus in the genome of which is inserted a DNA fragment coding for the above-mentioned polypeptide.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention se rapporte à une composition pharmaceutique pour traiter ou prévenir une tumeur maligne qui comprend, à titre d'agent thérapeutique, un polypeptide reconnu par l'anticorps produit par l'hybridome ATCC n° HB 8630, ou de manière alternative, un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour le polypeptide cité ci-dessus.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU <sup>+</sup>	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

<sup>+</sup> Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique .

## COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR LE TRAITEMENT OU LA PREVENTION D'UNE TUMEUR MALIGNE

La présente invention a pour objet une composition pharmaceutique destinée au traitement curatif ou à la prévention d'une tumeur maligne, plus particulièrement d'un carcinome, tout spécialement d'un cancer du sein.

La plupart des cellules tumorales expriment à leur surface des antigènes qui diffèrent  
5 soit qualitativement, soit quantitativement des antigènes présents à la surface des cellules normales correspondantes. Ces antigènes sont spécifiques lorsqu'ils sont uniquement exprimés par des cellules tumorales. Lorsqu'ils sont présents à la fois sur des cellules normales et tumorales, ces antigènes sont dits associés à la tumeur; dans ce cas, ils sont  
10 présents soit en plus grande quantité, soit sous une forme différente dans les cellules tumorales.

La grande majorité des antigènes de tumeur qui ont été jusqu'à présent caractérisés chez l'homme sont des antigènes humains associés à une tumeur (appelés par la suite antigènes associés). Parmi ceux-ci on distingue:

- les antigènes oncofoetaux, tel que l'antigène carcino-embryonnaire, qui sont  
15 présents dans les tissus foetaux et absents ou à l'état de trace dans les tissus adultes correspondants; leur expression est à nouveau induite de manière aberrante lors du développement d'une tumeur;

- les antigènes de différenciation qui ne sont normalement exprimés que pendant certaines étapes de la maturation d'un type particulier de cellules; les cellules tumorales  
20 qui expriment un tel antigène auraient pour origine une cellule bloquée dans sa différenciation;

- les produits des oncogènes qui commencent à être identifiés.

La spécificité d'un antigène associé à une tumeur est donc plutôt quantitative que qualitative puisque ce dernier peut être présent chez un individu normal, de manière localisée ou intermittente (période foeto-embryonnaire) ou à l'état de traces, et ne devient hyperexprimé (expression augmentée d'un facteur 10 à 1000 fois) que lors d'un processus  
5 de tumorigenèse. Lorsque cet antigène est normalement exprimé, il est reconnu par le système immunitaire comme partie du "Soi" tandis que son hyperexpression ou son expression aberrante peut déclencher une réponse immunitaire humorale ou cellulaire.

D'une manière générale, il existe deux grands types de réponse immunitaire : la  
10 réponse de type humoral qui est caractérisée par la production d'anticorps par les lymphocytes B et la réponse immunitaire à médiation cellulaire qui met en jeu des cellules effectrices i.e., essentiellement les macrophages et les lymphocytes T cytotoxiques ainsi que des cellules régulatrices de la réponse immunitaire, i.e., les lymphocytes T helper et supresseurs.

15 Une réponse immunitaire à médiation cellulaire nécessite la coopération des lymphocytes T helper et des cellules effectrices. Cette coopération s'effectue, en particulier, grâce à l'interleukine-2 et autres diverses lymphokines qui sont sécrétées par les lymphocytes T helper activés. Par la suite, l'interleukine-2 induit l'action des  
20 lymphocytes T cytotoxiques et les lymphokines déclenchent la réponse de phagocytose des macrophages. En parallèle, il existe de même un mécanisme supresseur de la réponse immunitaire à médiation cellulaire qui met en oeuvre les lymphocytes T supresseurs.

Il est maintenant bien connu que des patients atteints d'un cancer peuvent  
25 développer une réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire. Ceci a été mis en particulier en évidence en démontrant que le sérum de certains patients contenaient des anticorps anti-antigène de tumeur et que leur sérum était capable d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses in vitro. Néanmoins, dans la mesure où les régressions tumorales spontanées sont extrêmement rares, il semble que la réponse immunitaire que l'on observe  
30 in vitro reste inefficace in vivo. Dans le même ordre d'idées, il est aussi connu que les greffes de tumeurs ne sont pas souvent rejetées, même chez des animaux immuns, tandis que les allogreffes le sont toujours.

Bien qu'une réponse immunitaire puisse se développer à l'encontre d'une tumeur,  
35 il est douteux que celle-ci soit d'un réel bénéfice pour le malade. Tout semble indiquer qu'une tumeur échappe aux mécanismes de surveillance immunitaire de l'organisme. Divers modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène; pour une revue complète et détaillée, voir Scientific American, Medecine, Chapter 6, VIII Tumor Immunology, 1990. En principe, les antigènes de tumeur joueraient un rôle non négligable en modifiant  
40 ou détournant la réponse immunitaire en faveur de la tumeur plutôt qu'en faveur de l'individu.

Compte tenu de la complexité de la réponse immunitaire à l'encontre des tumeurs et de la médiocrité des connaissances actuelles dans ce domaine, la mise en oeuvre d'un vaccin anti-cancer n'est pas du tout évidente. Des études chez des animaux ont montré que l'immunisation à l'aide de cellules cancéreuses vivantes ou tuées pouvaient conduire à un  
5 rejet d'une greffe tumorale ultérieure. Des tentatives d'immunisation à l'aide de produits acellulaires ont généralement été moins réussies.

A ce jour, la possibilité de fabriquer un vaccin contre un cancer en employant un antigène associé à ce cancer reste donc controversée. Une objection théorique majeure à  
10 ce mode de traitement réside en ce qu'une réponse immunitaire ne serait pas suffisante pour prévenir ou soigner une tumeur et qu'il est fort douteux qu'un vaccin puisse être protecteur, c'est-à-dire capable d'empêcher ou de freiner le développement d'une tumeur.

Néanmoins, il a maintenant été trouvé qu'un antigène de tumeur associé, entre autre  
15 au cancer du sein peut, sous forme vaccinale ou thérapeutique, induire une réponse immunitaire qui protège contre une attaque tumorale ultérieure ou en cours de développement. Il s'agit plus précisément de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal H23 issu de l'hybridome ATCC N° HB 8630, déposé aux fins de la demande de brevet EPA 174 534 et publiquement disponible pour des travaux de recherche  
20 expérimentaux. L'anticorps H23 est d'autre part commercialement disponible auprès de Teva Pharmaceutical Industries Ltd, 5 Basel Street, Petah Tiqva, P.O. Box 1424, Tel-Aviv, Israël.

L'anticorps H23 a été généré à l'encontre de matériel particulaire présent dans le  
25 surnageant des cultures in vitro de la lignée de cellules mammaires tumorales T47D. Par la suite, il a été montré que l'anticorps H23 réagissait nettement avec une grande majorité de biopsies de tumeurs mammaires ainsi qu'avec le sérum et autres liquides physiologiques des patients présentant un cancer du sein. Par contre, l'anticorps H23 ne détecte pas d'antigène, ou sinon à l'état de trace, dans le cas d'individus sains.

30 L'antigène de tumeur reconnu par l'anticorps H23 est donc exprimé de manière aberrante par les cellules épithéliales du tissu mammaire cancéreux dans environ 90 % des cas de cancer du sein, tandis que chez un individu normal, son expression est très faible sinon nulle. Sa présence en quantité significative a été aussi détectée dans des tissus  
35 épithéliaux tumoraux autres que les tissus épithéliaux mammaires.

Chez un même patient, l'antigène de tumeur reconnu par l'anticorps H23 existe sous deux formes : une forme transmembranaire et une forme sécrétée dont les séquences en acides aminés sont respectivement montrées dans les identificateurs de séquence (IS) n° 1 et 2. La forme transmembranaire et la forme sécrétée présentent toutes deux un haut degré de polymorphisme. En effet, la séquence des deux formes d'antigène comprend une sous-unité particulière de 20 acides aminés qui apparaît encadrée dans chaque IS et qui peut être répétée en tandem plusieurs fois. La séquence de cette sous-unité a pour formule (I) : Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-X-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Y-Arg-Pro-X dans laquelle X est Pro ou Ala et Y est Thr ou Asn. D'un individu à l'autre, le nombre de répétitions en tandem peut varier de 20 à 80 environ et, entre autre, caractérise le type polymorphe. Enfin, il peut se faire que d'une répétition à l'autre, un minimum d'acides aminés (le plus souvent 1,2 ou 3 acides aminés) soit modifié.

D'autre part, il a été établi que la sous-unité de 20 acides aminés précédemment décrite était spécifique de l'antigène de tumeur réagissant avec l'anticorps H23 puisque cette sous-unité comporte l'épitope reconnu par cet anticorps.

En conséquence, l'invention propose une composition pharmaceutique destinée au traitement curatif ou à la prévention d'une tumeur maligne qui comprend, à titre d'agent thérapeutique, (i) un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 ou, de manière alternative, (ii) un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, en association avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

D'un point de vue plus général, l'invention a également pour objet, à titre d'agent thérapeutique pour le traitement ou la prévention d'une tumeur maligne, un polypeptide reconnu par l'anticorps H23.

De même, l'invention a aussi pour objet :

- l'usage (i) d'un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, ou, de manière alternative, l'usage (ii) d'un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 pour soigner ou prévenir une tumeur maligne ;

- une méthode de traitement curatif ou de prévention d'une tumeur maligne qui comprend l'acte d'administrer une quantité thérapeutiquement efficace (i) d'un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 ou, de manière alternative, (ii) d'un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. (Par "quantité thérapeutiquement efficace", on entend une quantité suffisante pour mettre en oeuvre une thérapie efficace).

Un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 peut être notamment un polypeptide qui comprend la séquence (I) : Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro-X-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Y-Arg-Pro-X, dans laquelle X est Pro ou Ala et Y est Thr ou Asn. La séquence (I) peut être la séquence complète du polypeptide reconnu par l'anticorps H23 ou bien représenter un fragment unique ou répété du polypeptide reconnu par l'anticorps H23.

Un polypeptide préféré reconnu par l'anticorps H23 est un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 dont la séquence présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée de 95 à 100 % inclus, avec la séquence de l'antigène du tissu épithélial humain reconnu par l'anticorps H23 (dans la suite du texte, cet antigène sera prénommé H23 - ETA) sous sa forme transmembranaire ou sécrétée.

5 Telle que montrée dans l'IS n° 1, la forme transmembranaire de H23 - ETA a une séquence en acides aminés commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times n)$ , tandis que, telle que montrée dans l'IS n° 2, la forme sécrétée de H23 - ETA a une séquence en acides aminés commençant par le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times n)$ . D'une façon tout à fait générale,  $n$  est un nombre de 1 à 80; de préférence,  $n$  est un nombre de 1 à 40; de manière tout à fait préférée,  $n$  est 2, 3 ou 4.

10 Plus précisément, les formes transmembranaire et sécrétée de H23 - ETA ont en commun une région N-terminale de 106 acides aminés (appelée par la suite région N-terminale) et une région médiane correspondant à l'ensemble des sous unités répétées; par contre leurs extrémités C-terminales divergent sensiblement. Les acides aminés de la position  $107 + (20 \times n)$  à la position  $149 + (20 \times n)$  sont identiques pour les deux formes et varient à partir de la position  $150 + (20 \times n)$ .

15 Un polypeptide préféré reconnu par l'anticorps H23 dont la séquence n'est pas identique à l'une de celles décrites dans les IS n° 1 et 2, se caractérise par au moins une mutation d'un acide aminé (mutation ponctuelle) distribuée au hasard dans les régions N- ou C-terminale. Le nombre de mutations totales doit bien sûr satisfaire le critère du degré d'homologie tel que précédemment établi. Par "mutation ponctuelle", on entend la délétion ou la substitution d'un acide aminé de la région N- ou C-terminale décrite dans l'IS n° 1  
20 ou 2 ainsi que l'addition d'un acide aminé au sein de la région N- ou C-terminale décrite dans l'IS n° 1 ou 2.

25 D'une manière générale, un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 peut être produit par les méthodes conventionnelles de synthèse chimique ou bien, lorsque la séquence d'acides aminés comprend un nombre de résidus important, par les techniques de l'ADN recombinant. Plus particulièrement, un procédé de préparation comprend l'acte de cultiver un micro-organisme hôte transformé par un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 et l'acte de récolter ledit polypeptide à partir de la culture. L'organisme hôte peut être n'importe quel micro-organisme capable d'être transformé, par exemple et sans limitation, une bactérie, une levure ou bien une cellule  
30 de mammifère, dans la mesure où le fragment d'ADN considéré est soit intégré dans le



génomme de l'organisme hôte, soit inséré dans un vecteur d'expression approprié, c'est-à-dire, capable de se répliquer chez l'organisme hôte. Bien entendu, le fragment d'ADN codant pour le polypeptide reconnu par l'anticorps H23 est placé sous le contrôle de régions comportant des signaux de transcription et de traduction appropriés. Vecteurs d'expression et régions de contrôle sont connus de l'homme du métier.

Au cours de la dernière décade, il a été proposé d'utiliser des virus recombinés, comme agents destinés à induire une réponse immunitaire à l'encontre d'organismes pathogènes variés. A cette fin, les adénovirus ou les poxvirus conviennent tout particulièrement. Pour usage dans la présente invention, les poxvirus aviaires, le poxvirus du canari, ou le virus de la vaccine sont tout à fait adaptés. Le virus de la vaccine présente une réaction immunitaire croisée avec le virus de la variole et, de ce fait, a été utilisé comme agent vaccinal anti-variologique depuis le 19<sup>e</sup> siècle. Au début des années 80, la variole a été considérée comme éradiquée de la surface du globe et l'Organisation Mondiale de la Santé a, en conséquence, jugé préférable d'arrêter de vacciner contre la variole. Le virus de la vaccine est donc maintenant disponible pour mettre en oeuvre des vaccins comprenant un virus de la vaccine dont le génome a été modifié de manière à exprimer des gènes hétérologues codant pour des déterminants antigéniques spécifiques d'un organisme vecteur d'une maladie autre que la variole.

C'est pourquoi l'agent thérapeutique d'une composition pharmaceutique selon l'invention peut être, de manière alternative, un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23.

Ce type de composition pharmaceutique présente l'avantage d'une production bon marché et d'une grande stabilité dans des conditions d'environnement variées. En particulier, les conditions de conservation ne sont pas contraignantes.

Les conditions générales d'obtention d'un virus de la vaccine capable d'exprimer un bloc d'expression d'une protéine hétérologue sont décrites dans le brevet européen EP 83 286 dont le contenu est ici incorporé par référence. Ces conditions sont applicables aux autres virus acceptables comme vecteurs dans la mesure où ces derniers possèdent au moins une région génomique non-essentielle dans laquelle un bloc d'expression peut être inséré.

Un virus de la vaccine dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 peut être aussi utilisé comme vecteur d'expression particulier en vue de produire ledit polypeptide en culture de cellules de mammifère, tel que précédemment indiqué.

Un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 ou un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour ledit polypeptide présente une activité anti tumorale in vivo dans le test suivant : on traite par deux fois, à dix jours d'intervalle entre les deux traitements, des souris de la lignée C3H ou des rats de la lignée Fisher, âgés de 4 à 5 semaines, avec soit, entre 10 et 500µg d'un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 ou soit, entre 10<sup>7</sup> et 10<sup>8</sup> pfu (unités formant plaque) d'un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour ledit polypeptide. Lorsque l'on utilise un polypeptide, le traitement s'effectue de préférence par injection sous-cutanée. Une scarification de la queue est préférée dans le cas d'un virus. Quinze jours après le premier traitement, on injecte de manière sous-cutanée environ 10<sup>4</sup> à 10<sup>7</sup> cellules tumorales syngéniques exprimant H23-ETA, qui ont été cultivées in vitro, traitées à la trypsine, lavées et resuspendues en tampon PBS (phosphate buffered saline) sous un volume d'environ 100 µl. En parallèle, on soumet de même des animaux non traités à une attaque tumorale identique. Environ 20 jours après l'injection des cellules, la taille des tumeurs sous-cutanées est plus petite chez les animaux traités par un polypeptide ou un virus que chez des animaux non traités.

Un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 ou un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour ledit polypeptide est de ce fait utile en vue de traiter ou de prévenir un état cancéreux, plus particulièrement une tumeur de type carcinome (tumeur développée par des cellules épithéliales), par exemple une tumeur mammaire.

Pour ces prescriptions, le dosage approprié varie en fonction, par exemple du polypeptide ou du virus employé, de l'individu traité, du mode d'administration, de l'utilisation à titre de vaccin ou de traitement, et de la nature et de la sévérité de l'état tumoral qui est traité. Cependant, en général, des résultats de vaccination satisfaisants chez des mammifères, par exemple des humains, sont indiqués comme pouvant être obtenus avec un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour ledit polypeptide, à un dosage unique ou répété une ou deux fois à environ 1 à 3 semaines d'intervalle, d'environ 10<sup>4</sup> pfu/kg à environ 10<sup>8</sup> pfu/kg du poids corporel du mammifère.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle, en particulier par voie sous-cutanée, par exemple sous forme de solution ou de suspension injectable. A titre de vaccin, une composition selon l'invention peut être administrée selon les modes conventionnellement pratiqués pour les vaccins déjà connus, par exemple en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Lorsqu'une composition selon l'invention est en usage dans le traitement curatif d'un cancer, elle peut être administrée fréquemment pendant une période suffisante pour que le traitement soit efficace. Une telle composition peut être

injectée avantageusement de manière intra-tumorale.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être préparée selon les techniques conventionnelles. Lorsque l'agent thérapeutique est un virus de la vaccine, ce virus est de préférence sous forme vivante atténuée. Des souches virales atténuées sont disponibles à ce jour; par exemple, la souche Copenhagen thymidine kinase négative. Pour obtenir les virus recombinants nécessaires pour mettre en oeuvre une composition selon l'invention, il suffit d'utiliser une telle souche. Enfin un virus recombinant peut être atténué par un traitement chimique approprié connu de l'homme du métier.

10

L'invention est illustrée ci-après, avec pour référence la Figure 1.

La Figure 1 représente de manière schématique un fragment d'ADN génomique codant pour la forme sécrétée de H23-ETA ( $\rightarrow$ 1) ou pour la forme transmembranaire de H23-ETA ( $\rightarrow$ 2). Les blocs et les vides symbolisent respectivement les exons et les introns. Le fond noir correspond à la séquence signal et le fond hachuré signifie les séquences répétées (au nombre de 4: a, b, c et d). Les fragments d'ADN n° 1 et 2 sont utilisés pour la construction d'un fragment complet codant pour la forme sécrétée de H23-ETA tandis que les fragments n° 3 à 5 sont utilisés pour construire un fragment complet codant pour la forme transmembranaire de H23-ETA. Les sites de restriction indiqués dans cette figure se retrouvent de même dans les IS n° 1 et 2.

15

20

#### Exemple 1

Des fragments d'ADN complémentaires et génomiques codant pour des portions de H23 sont isolés selon la procédure décrite dans Wreschner et al, Eur. J. Biochem. (1990) 189 : 463. Ces fragments sont utilisés par la suite pour reconstituer un fragment d'ADN codant pour l'antigène H23-ETA complet sous sa forme sécrétée ou transmembranaire.

25

Les constructions plasmidiques sont décrites ci-dessous, en référence à la Figure 1.

30

A. Préparation d'un virus de la vaccine capable de promouvoir la synthèse de la forme sécrétée de H23-ETA.

Un fragment d'ADN complémentaire EcoRI-PvuII (n° 1) est introduit entre les sites EcoRI et PvuII de la région d'insertion multiple du vecteur pPolyII décrit dans Lathe et al, Gene (1987) 57 : 193 pour donner le plasmide pETA-5'. Un fragment d'ADN génomique PvuII (n° 2), comportant 4 unités répétées, est introduit dans le site PvuII de la région d'insertion multiple de pETA-5', en aval du fragment n° 1 et en orientation appropriée. Dans les unités répétées a, b, c et d, les codons xxx<sub>1</sub> et xxx<sub>2</sub> sont

35

40

respectivement CCA (Pro) et CCC (Pro), CCA et CCC, GCA (Ala) et GCC, CCA et GCC. De même le codon yyy est ACC (Thr) dans les unités répétées a, b et c; le codon yyy est AAC (Asn) dans l'unité d.

5 Un fragment BamHI-SalI codant pour la forme sécrétée complète de H23-ETA est excisé du plasmide obtenu en dernier lieu. Puis, ce fragment est inséré entre les sites BamHI et SalI du vecteur de transfert ptg194-poly décrit dans Kieny et al, Bio/Technology, (1986) 4:790, en aval du promoteur du virus de la vaccine E7.5k et à l'intérieur du gène du virus de la vaccine codant pour la thymidine kinase.

10

Le vecteur de transfert obtenu au paragraphe précédent est utilisé par la suite pour transférer le bloc d'expression de la forme sécrétée de H23-ETA dans le génome du virus de la vaccine, souche Copenhagen, selon la méthode décrite dans Kieny et al, Nature (1984) 312 : 163. On obtient ainsi le virus de la vaccine VV-ETA-S.

15

B. Préparation d'un virus de la vaccine capable de promouvoir la synthèse de la forme transmembranaire de H23-ETA.

20 Un fragment d'ADN génomique PvuII-PstI (n° 3), comportant 4 unités répétées, est introduit entre les sites PvuII et PstI de la région d'insertion multiple de pETA-5', en aval du fragment n° 1 et en orientation appropriée. Dans les unités répétées a, b, c et d, les codons xxx<sub>1</sub> et xxx<sub>2</sub> sont respectivement CCA (Pro) et CCC (Pro), CCA et CCC, GCA (Ala) et GCC, CCA et GCC. De même le codon yyy est ACC (Thr) dans les unités répétées a, b et c; le codon yyy est AAC (Asn) dans l'unité d.

25

Un fragment EcoRI-PstI correspondant aux fragments clonés est excisé du dernier plasmide obtenu. L'extrémité cohésive EcoRI est transformée en extrémité franche par traitement avec la polymérase klenow. Puis, ce fragment est introduit entre le site XhoI, préalablement traité par la polymérase klenow, et le site PstI de la région d'insertion mutiple du vecteur pPolyII-Sfi/Not-14 décrit dans Lathe et al, supra, pour donner le plasmide pETA-T-5'.

30

Un fragment d'ADN complémentaire PstI-BalI (n° 4) est introduit entre les sites PstI et BalI de pETA-T-5'. Puis, un fragment d'ADN complémentaire BalI-BalI (n° 5) est 35 inséré dans le site BalI du plasmide obtenu en dernier lieu.

Un fragment BglII-SstI codant pour la forme transmembranaire complète de H23-ETA est excisé du plasmide obtenu au paragraphe précédent; puis, il est introduit entre les sites BamHI et SstI du vecteur de transfert ptg186-poly décrit dans Kieny et al, (1986) 40 supra, en aval du promoteur du virus de la vaccine E7.5k et à l'intérieur du gène du virus

de la vaccine codant pour la thymidine kinase.

Le vecteur de transfert obtenu au paragraphe précédent est utilisé par la suite pour transférer le bloc d'expression de la forme transmembranaire de H23-ETA dans le génome du virus de la vaccine, souche Copenhagen (VV-O), selon la méthode décrite dans Kieny et al, 1984, supra. On obtient ainsi le virus de la vaccine VV-ETA-T.

Exemple 2 : Préparation des stocks de virus.

10 Les stocks de virus purifiés sont préparés sur cellules BHK-21. Les cellules BHK-21 sont infectées par les virus recombinants VV-ETA-S et VV-ETA-T (0,1 pfu/cellule) pendant 48 heures. Après ce temps, les cultures sont congelées à -20°C, puis décongelées à température ambiante. Après destruction des parois cellulaires par 3 traitements successifs au "potter" dans un tampon hypotonique, les protéines solubles du surnageant  
15 sont chargées sur un coussin de saccharose 36 % (p/v) et centrifugées (SW 28 Beckman, 1h, 14 K). Le culot contenant le virus est repris en solution dans du Tris/HCl 10 mM pH8 et déposé sur un gradient linéaire (20-40 %) de saccharose. Après centrifugation (SW 28, 40 min, 14 K), la bande opalescente contenant le virus est reprise à l'aide d'une seringue et concentrée par centrifugation (SW 28, 20 K, 1h). Le virus est enfin repris dans un petit  
20 volume de Tris/Hcl 10 mM pH8 de façon à obtenir un stock viral titrant  $10^{10}$  pfu/ml environ.

Exemple 3 : Lignées cellulaires tumorales exprimant H23-ETA.

25 A. Construction des plasmides eucaryotes capable de promouvoir l'expression de H23-ETA.

Un fragment d'ADN BamHI-SalI, codant pour la forme sécrétée de H23-ETA est excisé du plasmide obtenu dans l'exemple 1A, premier paragraphe. Puis, il est réintroduit  
30 entre les sites BamHI et SalI de la région d'insertion multiple du plasmide pHMG décrit dans Gautier et al, Nucl. Acid Res., (1989) 17 (20): 83, de manière à être placé sous le contrôle du promoteur du gène de la 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme-A-réductase (HMGCR), en aval de la séquence signal du SV40 polyA. On obtient ainsi le plasmide pHMG-ETA-S.

35

De même, le plasmide pHMG-ETA-T est construit, de manière similaire, par insertion d'un fragment d'ADN BamHI-EcoRV issu du plasmide obtenu dans l'Exemple 1 B, paragraphe 2.

## B. Préparation des lignées cellulaires.

Des cellules de la lignée cellulaire tumorale FR3T3-ras-1 obtenue à partir de fibroblastes de rats Fisher par Matriceau et al, EMBO J. (1985) 4 : 1435 et de cellules de la lignée de carcinome mammaire de souris MM5t issue des souris C3H, sont cotransfectées (i) par pHMG-ETA-S et le plasmide pAG60 décrit dans Colbere-Garapin et al, J. Mol. Biol. (1981) 150 : 1 qui comporte un gène de résistance à la Généticine (G418) ou (ii) par pHMG-ETA-T et pAG60. Pour effectuer la transfection, on utilise la méthode de précipitation au phosphate de calcium de Graham et al, Virology (1973) 52 : 456 modifiée par Wigler et al, Cell (1978) 14 : 725.

Les clones transfectés sont sélectionnés en présence de 500 µl/ml de G418 et par la suite cultivés. La sélection des clones exprimant H23-ETA s'effectue par marquage des cellules à la peroxydase après réaction avec l'anticorps H23. Des lignées cellulaires à l'état pur sont obtenues par la méthode des dilutions limites et l'expression de H23-ETA est contrôlée.

Les lignées cellulaires sont prénommées comme suit :

- FR3T3-ras-1 (pAG60/pHMG-ETA-S) : F-S
- FR3T3-ras-1 (pAG60/pHMG-ETA-T) : F-T
- FR3T3-ras-1 (pAG60/pHMG) : F-C
- MM5tC3H (pAG60/pHMG-ETA-S) : M-S
- MM5tC3H (pAG60/pHMG-ETA-S) : M-T
- MM5tC3H (pAG60/pHMG-ETA-S) : M-C

### Exemple 4 : Mise en évidence de l'effet vaccinal de H23-ETA.

Des rats mâles et femelles de la lignée IOPS Fisher et des souris femelles de la lignée C3H âgés de 4 à 5 semaines sont immunisés de la façon suivante : une préparation virale purifiée de VV-ETA-S, VV-ETA-T ou VV-O est administrée aux animaux, par scarification de la queue, sous un volume de 10 µl correspondant à environ  $2.10^7$  pfu. Ce traitement est répété 10 jours après.

Les lignées tumorales F-S, F-T, F-C, M-S, M-T et M-C sont cultivées dans un milieu Dulbecco modifié (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, 100 unités de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cultures sont ensuite traitées à la trypsine, lavées, et suspendues en tampon PBS (phosphate buffered saline).

14 jours après la première étape d'immunisation,  $2.10^4$  cellules F-C,  $4.10^4$  cellules F-S,  $1.5 \cdot 10^5$  cellules F-T ou  $2.10^6$  M-C, M-S ou M-T sont injectées à un animal

de manière sous-cutanée, sous un volume de 100 µl.

L'apparition des tumeurs sous-cutanées est contrôlée quotidiennement. Le diamètre des tumeurs est mesuré en deux dimensions. Les données complètes de l'expérience et les 5 résultats sont présentés dans le tableau I ci-dessous :

Tableau I

Animal	Virus	Cellules tumorales	Nombre d'animaux présentant un nodule tumoral par rapport au nombre total d'animaux traités	Diamètre moyen des nodules tumoraux (en mm) mesuré x jours après l'injection des cellules	Pourcentage d'animaux exempts de tumeurs
10 Rats mâles de la lignée Fisher		F-C	4/4	31 (20 jours)	0
		F-S	3/4	25 (25 jours)	25
		F-T	3/6	25 (30 jours)	50
	VV-ETA-S	F-C	8/8	40 (20 jours)	0
		F-S	3/8	7,5 (25 jours)	62,5
		F-T	1/8	0,87 (30 jours)	87,5
	VV-ETA-T	F-C	8/8	32 (20 jours)	0
		F-S	1/8	0,38 (25 jours)	87,5
		F-T	0/8	0 (30 jours)	100
		F-S	10/10	11,2 (20 jours)	0
15 Rats femelles de la lignée Fisher		F-T	10/10	25 (20 jours)	0
	VV-ETA-S	F-S	9/10	16 (20 jours)	10
		F-T	9/10	30 (20 jours)	10
	VV-ETA-T	F-S	5/10	1,7 (20 jours)	50
		F-T	5/10	2,8 (20 jours)	50
	VV-O	F-S	10/10	19,6 (20 jours)	0
		F-T	10/10	28 (20 jours)	0
	VV-ETA-S	F-S	8/10	10,6 (20 jours)	20
		F-T	9/9	33,8 (20 jours)	0
	VV-ETA-T	F-S	5/10	0,1 (25 jours)	50
		F-T	1/10		90

Le tableau I montre que, lorsque les animaux sont soumis à une infection par F-S ou F-T, la fréquence d'apparition des tumeurs dans un lot d'animaux préalablement traités 20 à l'aide du virus de la vaccine VV-ETA-S ou VV-ETA-T est moins élevée que dans les lots d'animaux non traités ou traités avec un virus de la vaccine VV-O. D'autre part, la taille des nodules tumoraux qui apparaissent chez des animaux préalablement traités avec VV-ETA-S ou VV-ETA-T est beaucoup plus petite que celle des nodules tumoraux

observés chez les animaux non traités ou traités avec VV-O.

L'immunisation à l'aide de VV-ETA-S ou VV-ETA-T n'est efficace que dans le cas des tumeurs induites par des cellules exprimant la forme sécrétée ou transmembranaire de H23-ETA. L'effet vaccinal des virus est donc bien spécifique.

Enfin, il semble que l'effet vaccinal de VV-ETA-T soit supérieur à celui de VV-ETA-S, quelle que soit la forme de H23-ETA exprimée par les cellules induisant les tumeurs.

#### Exemple 5 : Mise en évidence de l'effet curatif de H23-ETA.

Des rats de la lignée Fisher sont infectés par des cellules tumorales, tel que décrit dans l'Exemple 4. Dès l'apparition des tumeurs (10 à 15 jours après), on procède au traitement à l'aide des préparations virales, tel que décrit dans l'Exemple 4.

Les données et résultats de l'expérience sont présentés dans le tableau II ci-dessous :

Tableau II

Virus	Cellules tumorales	Nombre d'animaux présentant un nodule tumoral par rapport au nombre total d'animaux traités		Diamètre moyen des des tumeurs mesuré (en mm)	
		25 jours après l'injection	50 jours après l'injection	25 jours après l'injection	50 jours après l'injection
VV-O	F-S	10/10	10/10	27.8	tous morts
	F-T	10/10	10/10	27.7	tous morts
VV-ETA-S	F-S	10/10	10/10	31.5	tous morts
	F-T	9/10	7/10	15.5	8.5
VV-ETA-T	F-S	9/10	10/10	26.8	50.2
	F-T	7/10	7/10	11.6	9.4

Le Tableau II montre que le traitement d'une infection par VV-ETA-S ou VV-ETA-T a une incidence favorable sur la fréquence d'apparition et la taille des tumeurs par rapport au test contrôle. D'autre part, il semble que VV-ETA-T soit plus efficace que VV-ETA-S.



IDENTIFICATEUR DE SEQUENCE N° 1

**Objet:** La forme transmembranaire de l'antigène H23-ETA

**Type de séquence:** Séquence d'un fragment d'ADN et la séquence d'acides aminés correspondante

5 **Type de molécule:** ADN complémentaire

**Origine:** Lignée de carcinome mammaire T47D

**Caractéristiques du fragment d'ADN complet:**

Fragment EcoRI-Ball

Séquence codante: du nucléotide 58 au nucléotide 1362+(60xn)

10 **Caractéristiques de la séquence en acides aminés:**

Peptide signal: de l'a.a. -21 à l'a.a. -1

Forme mature: de l'a.a. 1 à l'a.a. 414\*, \* signifiant [(20xn)] dans lequel n est un nombre de 1 à 80

15 **Séquence répétée:** Telle que montrée encadrée ci-dessous, dans laquelle X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> sont indépendamment Pro ou Ala et Y est Thr ou Asn

GAATTCCTG GCTGCTTGAA TCTGTTCTGC CCCCTCCCCA CCCATTTTCAC	50
CACCACC ATG ACA CCG GGC ACC CAG TCT CCT TTC TTC CTG	90
Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu	
-21 -20 -15	
CTG CTG CTC CTC ACA GTG CTT ACA GTT GTT ACA GGT TCT	129
Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser	
-10 -5 -1 1	
GGT CAT GCA AGC TCT ACC CCA GGT GGA GAA AAG GAG ACT	168
Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr	
5 10 15	
TCG GCT ACC CAG AGA AGT TCA GTG CCC AGC TCT ACT GAG	207
Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu	
20 25	

- 16 -

AAG AAT GCT GTG AGT ATG ACC AGC AGC GTA CTC TCC AGC Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser 30 35 40	246
CAC AGC CCC GGT TCA GGC TCC TCC ACC ACT CAG GGA CAG His Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln 45 50 55	285
GAT GTC ACT CTG GCC CCG GCC ACG GAA CCA GCT TCA GGT Asp Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly 60 65	324
PvuII TCA GCT GCC ACC TGG GGA CAG GAT GTC ACC TCG GTC CCA Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val Pro 70 75 80	363
GTC ACC AGG CCA GCC CTG GGC TCC ACC ACC CCG CCA GCC Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr Pro Pro Ala 85 90	402
CAC GAT GTC ACC TCA GCC CCG GAC AAC AAG CCA GCC CCG His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro 95 100 105	
<hr/>	
GGC TCC ACC GCC CCC xxx GCC CAC GGT GTC ACC TCG GCC Gly Ser Thr Ala Pro X <sub>1</sub> Ala His Gly Val Thr Ser Ala	
<hr/>	
CCG GAC yyy AGG CCG xxx TTG GGC TCC ACC GCC CCT CCA Pro Asp Y Arg Pro X <sub>2</sub> Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro n 110*	459 + (60xn)
GTC CAC AAT GTC ACC TCG GCC TCA GGC TCT GCA TCA GGC Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly 115* 120* 125*	498 + (60xn)
TCA GCT TCT ACT CTG GTG CAC AAC GGC ACC TCT GCC AGG Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg 130* 135*	537 + (60xn)
GCT ACC ACA ACC CCA GCC AGC AAG AGC ACT CCA CCC AGC Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser 140* 145* 150*	576 + (60xn)
ATT CCC AGC CAC CAC TCT GAT ACT CCT ACC ACC CTT GCC Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala 155* 160* 165*	615 + (60xn)

- 17 -

AGC CAT AGC ACC AAG ACT GAT GCC AGT AGC ACT CAC CAT Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His 170* 175*	654 + (60xn)
AGC ACG GTA CCT CCT CTC ACC TCC TCC AAT CAC AGC ACT Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr 180* 185* 190*	693 + (60xn)
TCT CCC CAG TTG TCT ACT GGG GTC TCT TTC TTT TTC CTG Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu 195* 200*	732 + (60xn)
TCT TTT CAC ATT TCA AAC CTC CAG TTT AAT TCC TCT CTG Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu 205* 210* 215*	771 + (60xn)
PstI	
GAA GAT CCC AGC ACC GAC TAC TAC CAA GAG CTG CAG AGA Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg 220* 225* 230*	810 + (60xn)
GAC ATT TCT GAA ATG TTT TTG CAG ATT TAT AAA CAA GGG Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly 235* 240*	849 + (60xn)
GGT TTT CTG GGC CTC TCC AAT ATT AAG TTC AGG CCA GGA5 Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly 245* 250* 255*	888 + (60xn)
TCT GTG GTG GTA CAA TTG ACT CTG GCC TTC CGA GAA GGT Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly 260* 265*	927 + (60xn)
ACC ATC AAT GTC CAC GAC GTG GAG ACA CAG TTC AAT CAG Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln 270* 275* 280*	966 + (60xn)
TAT AAA ACG GAA GCA GCC TCT CGA TAT AAC CTG ACG ATC Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile 285* 290* 295*	1005 + (60xn)
TCA GAC GTC AGC GTG AGT CAT GTG CCA TTT CCT TTC TCT Ser Asp Val Ser Val Ser His Val Pro Phe Pro Phe Ser 300* 305*	1044 + (60xn)
GCC CAG TCT GGG GCT GGG GTG CCA GGC TGG GGC ATC GCG Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala 310* 315* 320*	1083 + (60xn)
Bali	
CTG CTG GTG CTG GTC TGT GTT CTG GTT GCG CTG GCC ATT Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile 325* 330*	1122 + (60xn)

- 18 -

GTC TAT CTC ATT GCC TTG GCT GTC TGT CAG TGC CGC CGA	1161 + (60xn)
Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg	
335* 340* 345*	
AAG AAC TAC GGG CAG CTG GAC ATC TTT CCA GCC CGG GAT	1200 + (60xn)
Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp	
350* 355* 360*	
ACC TAC CAT CCT ATG AGC GAG TAC CCC ACC TAC CAC ACC	1239 + (60xn)
Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr	
365* 370*	
CAT GGG CGC TAT GTG CCC CCT AGC AGT ACC GAT CGT AGC	1278 + (60xn)
His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser	
375* 380* 385*	
CCC TAT GAG AAG GTT TCT GCA GGT AAT GGT GGC AGC AGC	1317 + (60xn)
Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser	
390* 395*	
CTC TCT TAC ACA AAC CCA GCA GTG GCA GCC ACT TCT GCC	1356 + (60xn)
Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala	
400* 405* 410*	
AAC TTG TAG GGGCACGTCTG CCCTCTGAGC TGAGTGG	1392 + (60xn)
Asn Leu Ter	

IDENTIFICATEUR DE SEQUENCE N° 2

5 **Objet:** La forme soluble de l'antigène H23-ETA

**Type de séquence:** Séquence d'un fragment d'ADN et la séquence d'acides aminés correspondante

5 **Type de molécule:** ADN complémentaire

**Origine:** Lignée de carcinome mammaire T47D

**Caractéristiques du fragment d'ADN complet:**

Fragment EcoRI-PvuII

Séquence codante: du nucléotide 58 au nucléotide 858+(60xn)

10 **Caractéristiques de la séquence en acides aminés:**

Peptide signal: de l'a.a. -21 à l'a.a. -1

Forme mature: de l'a.a. 1 à l'a.a. 246\*, \* signifiant [(20xn)] dans lequel n est un nombre de 1 à 80

Séquence répétée: Telle que montrée encadrée ci-dessous, dans laquelle X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> sont indépendamment Pro ou Ala et Y est Thr ou Asn

15

GAATTCCTG GCTGCTTGAA TCTGTTCTGC CCCCTCCCCA CCCATTTCAC	50
CACCACC ATG ACA CCG GGC ACC CAG TCT CCT TTC TTC CTG	90
Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu	
-21 -20 -15	
CTG CTG CTC CTC ACA GTG CTT ACA GTT GTT ACA GGT TCT	129
Leu Leu Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser	
-10 -5 -1 1	
GGT CAT GCA AGC TCT ACC CCA GGT GGA GAA AAG GAG ACT	168
Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr	
5 10 15	
TCG GCT ACC CAG AGA AGT TCA GTG CCC AGC TCT ACT GAG	207
Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu	
20 25	

- 20 -

AAG AAT GCT GTG AGT ATG ACC AGC AGC GTA CTC TCC AGC 246  
 Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser  
 30 35 40

CAC AGC CCC GGT TCA GGC TCC TCC ACC ACT CAG GGA CAG 285  
 His Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln  
 45 50 55

GAT GTC ACT CTG GCC CCG GCC ACG GAA CCA GCT TCA GGT 324  
 Asp Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly  
 60 65

PvuII

TCA GCT GCC ACC TGG GGA CAG GAT GTC ACC TCG GTC CCA 363  
 Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val Pro  
 70 75 80

GTC ACC AGG CCA GCC CTG GGC TCC ACC ACC CCG CCA GCC 402  
 Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr Pro Pro Ala  
 85 90

CAC GAT GTC ACC TCA GCC CCG GAC AAC AAG CCA GCC CCG  
 His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro  
 95 100 105

GGC TCC ACC GCC CCC xxx GCC CAC GGT GTC ACC TCG GCC  
 Gly Ser Thr Ala Pro X<sub>1</sub> Ala His Gly Val Thr Ser Ala

CCG GAC yyy AGG CCG xxx TTTG GGC TCC ACC GCC CCT CCA 459 + (60xn)  
 Pro Asp Y Arg Pro X<sub>2</sub> Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro  
 n 110\*

GTC CAC AAT GTC ACC TCG GCC TCA GGC TCT GCA TCA GGC 498 + (60xn)  
 Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly  
 115\* 120\* 125\*

TCA GCT TCT ACT CTG GTG CAC AAC GGC ACC TCT GCC AGG 537 + (60xn)  
 Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg  
 130\* 135\*

GCT ACC ACA ACC CCA GCC AGC AAG AGC ACT CCA TTC TCA 576 + (60xn)  
 Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser  
 140\* 145\* 150\*

ATT CCC AGC CAC CAC TCT GAT ACT CCT ACC ACC CTT GCC 615 + (60xn)  
 Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala  
 155\* 160\* 165\*

AGC CAT AGC ACC AAG ACT GAT GCC AGT AGC ACT CAC CAT 654 + (60xn)  
 Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His

170\*                      175\*  
 AGC ACG GTA CCT CCT CTC ACC TCC TCC AAT CAC AGC ACT                      693 + (60xn)  
 Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr  
 180\*                      185\*                      190\*

TCT CCC CAG TTG TCT ACT GGG GTC TCT TTC TTT TTC CTG 732 + (60xn)  
Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu  
195\* 200\*

TCT TTT CAC ATT TCA AAC CTC CAG TTT AAT TCC TCT CTG 771 + (60xn)  
Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu  
205\* 210\* 215\*

GAA GAT CCC AGC ACC GAC TAC TAC CAA GAG CTG CAG AGA 810 + (60xn)  
Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg  
220\* 225\* 230\*

GAC ATT TCT GAA ATG GTG AGT ATC GGC CTT TCC TTC CCC 849 + (60xn)  
 Asp Ile Ser Glu Met Val Ser Ile Gly Leu Ser Phe Pro  
 235\* 240\*

ATG CTC CCC TGA AGCAGCCATC AGAACTGTCC ACACCCCTTTG 891 + (60xn)  
Met Leu Pro Ter  
245\*

CATCAAGCCT	GAGTCCTTTC	CCTCTCACCC	CAGTTTTTGC	AGATTTATAA	941 + (60xn)
ACAAGGGGGT	TTTCTGGGCC	TCTCCAATAT	TAAGTTCAGG	TACAGTTCTG	991 + (60xn)
GGTGTGGACC	CAGTGTGGTG	GTTGGAGGGT	TGGGTGGTGG	TCATGACCGT	1041 + (60xn)
AGGAGGGACT	GGTCGCACTT	AAGGTTGGGG	GAAGAGTCGT	GAGCCAGAGC	1091 + (60xn)
TGGGACCCGT	GGCTGAAGTG	CCCATTTCCT	TGTGACCAGG	CCAGGATCTG	1141 + (60xn)
TGGTGGTACA	ATTGACTCTG	GCCTTCGGAG	AAGGTACCAT	CAATGTCCAC	1191 + (60xn)
GACGTGGAGA	CACAGTTCAA	TCAGTATAAA	ACGGAAGCAG	CCTCTCGATA	1241 + (60xn)
TAACCTGACG	ATCTCAGACG	TCAGCGGTGA	GGCTACTTCC	CTGGCTGCAG	1291 + (60xn)
CCCAGCACCA	TGCCGGGGCC	CTCTCCTTCC	AGTGCCTGGG	TCCCCGCTCT	1341 + (60xn)
TTCTTtagTG	CTGGCAGCGG	GAGGGGCGCC	TCCTCTGGGA	GACTGCCCTG	1391 + (60xn)
ACCACTGCTT	TTCTTTTTAG	TGAGTCATGT	GCCATTTCTT	TTCTCTGCCC	1441 + (60xn)
AGTCTGGGGC	TGGGGTGCCA	GGCTGGGGCA	TCGCGCTGCT	GGTGCTGGTC	1491 + (60xn)
TGTGTTCTGG	TTGCGCTGGC	CATTGTCTAT	CTCATTGCCT	TGGTGAGTGC	1541 + (60xn)
AGTCCCTGGC	CCTGATCAGA	GCCCCCGGGT	AGAAGGCACT	CCATGGCCTG	1591 + (60xn)
CCATAACCTC	CTATCTCCCC	AGGCTGTCTG	TCAGTGCCGC	CGAAAGAACT	1641 + (60xn)
ACGGGCAG					1649 + (60xn)

REVENDICATIONS

1. Une composition pharmaceutique pour traiter ou prévenir une tumeur maligne qui comprend, à titre d'agent thérapeutique, un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 en association avec un diluent ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique
- 5 2. Une composition selon la revendication 1 dans laquelle le polypeptide reconnu par l'anticorps H23 comprend une séquence répétée  $\underline{n}$  fois,  $\underline{n}$  étant un nombre de 1 à 80; et de formule (I) : Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro- $X_1$ -Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Y-Arg-Pro- $X_2$ , dans laquelle  $X_1$  et  $X_2$  sont indépendamment Pro ou Ala et Y est Thr ou Asn.
- 10 3. Une composition selon la revendication 2 dans laquelle le polypeptide reconnu par l'anticorps H23 est un polypeptide comprenant la séquence de formule (I) répétée  $\underline{n}$  fois dont la séquence complète présente un degré d'homologie d'au moins 80 % avec  
15 (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times \underline{n})$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times \underline{n})$ ; le nombre  $\underline{n}$  relatif à la séquence de formule (I) dudit polypeptide d'une part, et celui relatif à la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 ou 2 d'autre part, étant de manière dépendante un nombre de 1 à 80.
- 20 4. Une composition selon la revendication 3 dans laquelle le polypeptide reconnu par l'anticorps H23 est un polypeptide comprenant la séquence de formule (I) répétée  $\underline{n}$  fois dont la séquence complète présente un degré d'homologie d'au moins 80 % avec  
25 (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times \underline{n})$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times \underline{n})$ ; le nombre  $\underline{n}$  relatif à la séquence de formule (I) dudit polypeptide d'une part, et celui relatif à la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 ou 2 d'autre part, étant de manière dépendante, 2, 3 ou 4.



5. Une composition selon la revendication 3 dans laquelle le polypeptide reconnu par l'anticorps H23 a pour séquence (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times n)$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times n)$ ;  $n$  étant un nombre de 1 à 80.
6. Une composition selon la revendication 5 dans laquelle le polypeptide reconnu par l'anticorps H23 a pour séquence (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times n)$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times n)$ ;  $n$  étant 2,3 ou 4.
7. Une composition pharmaceutique pour traiter ou prévenir une tumeur maligne qui comprend, à titre d'agent thérapeutique, un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, ledit fragment d'ADN étant placé sous le contrôle de signaux de transcription et de traduction appropriés.
8. Une composition selon la revendication 7 qui comprend un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23; ledit polypeptide comprenant une séquence répétée  $n$  fois,  $n$  étant un nombre de 1 à 80; et de formule (I) : Pro-Gly-Ser-Thr-Ala-Pro- $X_1$ -Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Y-Arg-Pro- $X_2$ , dans laquelle  $X_1$  et  $X_2$  sont indépendamment Pro ou Ala et Y est Thr ou Asn.
9. Une composition selon la revendication 8 qui comprend un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, comprenant la séquence de formule (I) répétée  $n$  fois et dont la séquence complète présente un degré d'homologie d'au moins 80 % avec (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times n)$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times n)$ ; le nombre  $n$  relatif à la séquence de formule (I) dudit polypeptide d'une part, et celui relatif à la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 ou 2 d'autre part, étant de manière dépendante un nombre de 1 à 80.

10. Une composition selon la revendication 9 qui comprend un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, comprenant la séquence de formule (I) répétée  $\underline{n}$  fois et dont la séquence complète présente un degré d'homologie d'au moins 80 % avec (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times \underline{n})$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times \underline{n})$ ; le nombre  $\underline{n}$  relatif à la séquence de formule (I) dudit polypeptide d'une part, et celui relatif à la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 ou 2 d'autre part, étant de manière dépendante 2, 3 ou 4.
11. Une composition selon la revendication 9 qui comprend un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, ayant pour séquence (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times \underline{n})$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times \underline{n})$ ;  $\underline{n}$  étant un nombre de 1 à 80.
12. Une composition selon la revendication 11 qui comprend un virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23, ayant pour séquence (i) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 1 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu leucine en position  $414 + (20 \times \underline{n})$  ou (ii) la séquence telle que montrée dans l'IS n° 2 commençant avec le résidu thréonine en position 1 et finissant avec le résidu proline en position  $246 + (20 \times \underline{n})$ ;  $\underline{n}$  étant 2, 3 ou 4.
13. Une composition selon n'importe laquelle des revendications 7 à 12 dans laquelle le virus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 est un poxvirus.
14. Une composition selon n'importe laquelle des revendications 7 à 12 dans laquelle le poxvirus dans le génome duquel est inséré un fragment d'ADN codant pour un polypeptide reconnu par l'anticorps H23 est le virus de la vaccine.

15. A titre d'agent thérapeutique pour le traitement ou la prévention d'une tumeur maligne, un polypeptide reconnu par l'anticorps H23.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 91/00835

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
CIB 5	C07K15/00	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
CIB 5	C07K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>*</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	WO,A,8 805 054 (IMPERIAL CANCER RESEARCH) 14 July 1988 see page 43, line 2 - page 46, line 9 see page 1, line 1 - line 10; claims 3,32 see page 10, line 12 - line 17 ---	1-15
X	EP,A,0 369 816 (UNIVERSITY OF MELBOURNE) 23 May 1990 see page 5, line 13 - line 18; claim 26 ---	1-6,15
X	WO,A,9 005 142 (IMPERIAL CANCER RESEARCH) 17 May 1990 see page 10, line 20 - line 25 ---	7-14
A	WO,A,8 903 429 (HEALTH SEARCH INC) 20 April 1989 see page 1, line 7 - line 22 ---	7-14
A	EP,A,0 174 534 (TEL AVIV UNIVERSITY) 19 March 1986 (cited in the application) -----	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>*</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
13 December 1991 (13.12.1991)	06 January 1992 (06.01.1992)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100835  
SA 52902

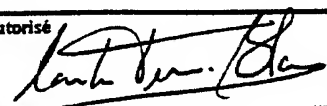
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 13/12/91

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8805054	14-07-88	AU-A- 1103988	27-07-88
		EP-A- 0341252	15-11-89
		JP-T- 2501828	21-06-90
-----	-----	-----	-----
EP-A-0369816	23-05-90	CA-A- 2003211	17-05-90
-----	-----	-----	-----
WO-A-9005142	17-05-90	EP-A- 0442926	28-08-91
-----	-----	-----	-----
WO-A-8903429	20-04-89	AU-A- 2427588	02-05-89
		BE-A- 1002134	24-07-90
		FR-A- 2621487	14-04-89
		GB-A- 2217718	01-11-89
		JP-T- 2500879	29-03-90
		NL-A- 8820679	03-07-89
-----	-----	-----	-----
EP-A-0174534	19-03-86	US-A- 4707438	17-11-87
		AU-B- 588542	21-09-89
		AU-A- 4649585	27-02-86
		CA-A- 1248471	10-01-89
		JP-A- 61132182	19-06-86
-----	-----	-----	-----

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00835

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 C07K15/00		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C07K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	WO,A,8 805 054 (IMPERIAL CANCER RESEARCH) 14 Juillet 1988 voir page 43, ligne 2 - page 46, ligne 9 voir page 1, ligne 1 - ligne 10; revendications 3,32 voir page 10, ligne 12 - ligne 17 ---	1-15
X	EP,A,0 369 816 (UNIVERSITY OF MELBOURNE) 23 Mai 1990 voir page 5, ligne 13 - ligne 18; revendication 26 ---	1-6,15
X	WO,A,9 005 142 (IMPERIAL CANCER RESEARCH) 17 Mai 1990 voir page 10, ligne 20 - ligne 25 ---	7-14
A	WO,A,8 903 429 (HEALTH SEARCH INC) 20 Avril 1989 voir page 1, ligne 7 - ligne 22 ---	7-14
-/--		
<p><sup>o</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
13 DECEMBRE 1991	- 6. 01. 92	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	C. TURMO 	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA  
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie <sup>o</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	EP,A,0 174 534 (TEL AVIV UNIVERSITY) 19 Mars 1986 cité dans la demande  ---	



**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100835  
SA 52902

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 13/12/91  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 13/12/91

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8805054	14-07-88	AU-A- 1103988	27-07-88
		EP-A- 0341252	15-11-89
		JP-T- 2501828	21-06-90
EP-A-0369816	23-05-90	CA-A- 2003211	17-05-90
WO-A-9005142	17-05-90	EP-A- 0442926	28-08-91
WO-A-8903429	20-04-89	AU-A- 2427588	02-05-89
		BE-A- 1002134	24-07-90
		FR-A- 2621487	14-04-89
		GB-A- 2217718	01-11-89
		JP-T- 2500879	29-03-90
		NL-A- 8820679	03-07-89
EP-A-0174534	19-03-86	US-A- 4707438	17-11-87
		AU-B- 588542	21-09-89
		AU-A- 4649585	27-02-86
		CA-A- 1248471	10-01-89
		JP-A- 61132182	19-06-86